

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TBC) adalah salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia dan disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Tuberkulosis (TBC) masih menjadi tantangan kesehatan global, termasuk di Indonesia yang merupakan salah satu dari sepuluh negara dengan beban TBC tertinggi (Septiani et al., 2025). Menurut data dari WHO secara global estimasi kasus TBC sebesar 10,7 juta orang dengan 1,23 juta kematian. Indonesia masih termasuk negara dengan beban TB tinggi di dunia. Sebagian besar kasus TB disumbangkan dari negara dengan beban TB tertinggi. Lima dari 30 negara tertinggi penyumbang kasus TB adalah India (25%), Indonesia (10%), Filipina (6,8%), Cina (6,5%), Pakistan (6,3%) (World Health Organization, 2025). Data dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia juga memperkuat fakta ini dengan angka kasus TBC sebanyak 1.016.475 sepanjang periode 2024 hingga Maret 2025, dengan 23.858 kematian pasien. Pada 2024, Indonesia telah mencatatkan 889 ribu notifikasi kasus TBC. Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan menyatakan bahwa berdasarkan data per 20 November 2024, kasus baru TBC berada di angka 27.256 kasus di Sulsel. Berdasarkan hal tersebut pengembangan vaksin yang efektif perlu dilakukan untuk mengakhiri penyebaran dan kematian akibat TBC global pada tahun 2030 khususnya Indonesia.

Vaksin yang hingga saat ini digunakan secara luas dalam upaya pencegahan TBC adalah vaksin Bacillus Calmette–Guérin (BCG), yang telah diterapkan secara global sejak tahun 1921. Vaksin BCG diketahui berperan penting dalam menurunkan risiko penyebaran MTB dari lokasi infeksi primer ke aliran darah, sehingga mampu mencegah terjadinya bentuk TBC berat, seperti TBC milier dan meningitis TBC, khususnya pada anak-anak. Oleh karena itu, vaksin ini masih menjadi bagian utama dalam program imunisasi nasional di berbagai negara dengan beban TBC tinggi. Meskipun demikian, efektivitas vaksin BCG dalam memberikan perlindungan terhadap tuberkulosis paru pada remaja dan dewasa menunjukkan hasil yang sangat bervariasi. Vaksin ini tidak selalu mampu mencegah terjadinya infeksi primer MTB maupun reaktivasi infeksi laten menjadi penyakit aktif. Berbagai studi menunjukkan bahwa tingkat perlindungan vaksin BCG bersifat sub optimal dan belum memadai untuk mencapai pengendalian TBC secara menyeluruh (Lawrence, 2024). Keterbatasan perlindungan vaksin BCG terhadap infeksi dan penyakit TBC paru tersebut menjadi tantangan besar dalam upaya pengendalian tuberkulosis secara global. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan strategi vaksinasi baru yang lebih efektif, mampu menginduksi respons imun yang kuat dan spesifik, serta memberikan perlindungan jangka panjang. Pengembangan vaksin generasi baru yang menargetkan antigen spesifik MTB, khususnya yang relevan dengan strain yang beredar di populasi lokal.

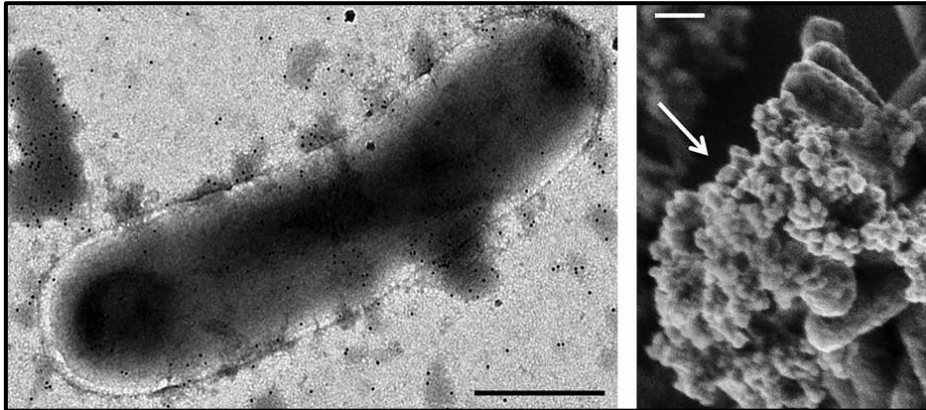
Salah satu pendekatan inovatif dalam upaya pengendalian tuberkulosis adalah pengembangan vaksin berbasis DNA yang memanfaatkan protein antigenik yang dikode oleh gen spesifik MTB. Vaksin DNA merupakan jenis vaksin yang dikembangkan melalui teknik rekayasa genetika dengan menggunakan plasmid DNA yang membawa gen pengode antigen, sehingga antigen tersebut dapat diekspresikan langsung di dalam sel inang. Pendekatan ini mampu menstimulasi respons imun humoral dan seluler tanpa menimbulkan risiko infeksi karena tidak melibatkan patogen hidup (Aisyah dan Mulyani, 2024). Keunggulan ini menjadikan vaksin DNA sebagai kandidat potensial untuk pengembangan vaksin generasi baru yang lebih aman dan spesifik. Salah satu gen yang menarik perhatian dalam pengembangan vaksin DNA tuberkulosis adalah gen Rv3874, yang mengode protein EsxB atau Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10). Protein CFP-10 merupakan protein sekretori yang dilepaskan melalui sistem sekresi tipe VII (ESX-1), yang dikendalikan oleh gen-gen yang terletak di dalam lokus RD1 (Region of Difference 1) pada genom MTB. Lokus RD1 diketahui berperan penting dalam virulensi *M. tuberculosis*, sehingga protein yang dihasilkannya, termasuk CFP-10, memiliki peran signifikan dalam interaksi patogen dengan sistem imun inang (Gcebe et al., 2024). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini menjadi penting untuk dilakukan sebagai langkah awal dalam pengembangan protein CFP-10 rekombinan yang dikodekan oleh gen Rv3874. Studi ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah dalam memahami potensi CFP-10 sebagai antigen vaksin, serta menjadi bahan pertimbangan dalam perancangan vaksin tuberkulosis yang lebih efektif, spesifik, dan mampu memberikan perlindungan yang lebih optimal.

I.2 Dasar Teori

I.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

MTB adalah spesies bakteri patogen dalam keluarga *Mycobacteriaceae* dan penyebab sebagian besar kasus tuberkulosis, yang menginfeksi sel dendritik, monosit, makrofag, dan sel epitel alveolus (Huang et al., 2025). MTB adalah golongan bakteri berbentuk batang, tidak membentuk spora, bersifat aerob. Bakteri ini tidak mudah untuk dibedakan dalam pewarnaan, akan tetapi jika telah diberi pewarnaan, akan sukar dilunturkan dengan asam dan alkohol. Oleh karenanya MTB disebut pula bakteri tahan asam atau disingkat BTA. MTB yang menyebabkan penyakit TBC merupakan bakteri berbentuk batang tahan asam dan merupakan aerob obliogot (Karolina et al., 2024).

MTB memiliki karakteristik yang membedakannya dari bakteri patogen lain karena memiliki dinding sel yang kompleks dan kaya akan lipid serta lipoglikan. Dinding sel MTB terdiri atas membran plasma yang tersusun dari beragam protein, lipid, dan karbohidrat yang terikat secara non-kovalen serta memiliki makromolekul utama yang terikat secara kovalen, yaitu asam mikolat, arabinogalactan, dan peptidoglikan. Bagian paling luar terdapat kapsul yang mengandung lipid, protein, dan polisakarida yang berperan dalam interaksi dengan lingkungan luar bakteri (Lin et al., 2024).

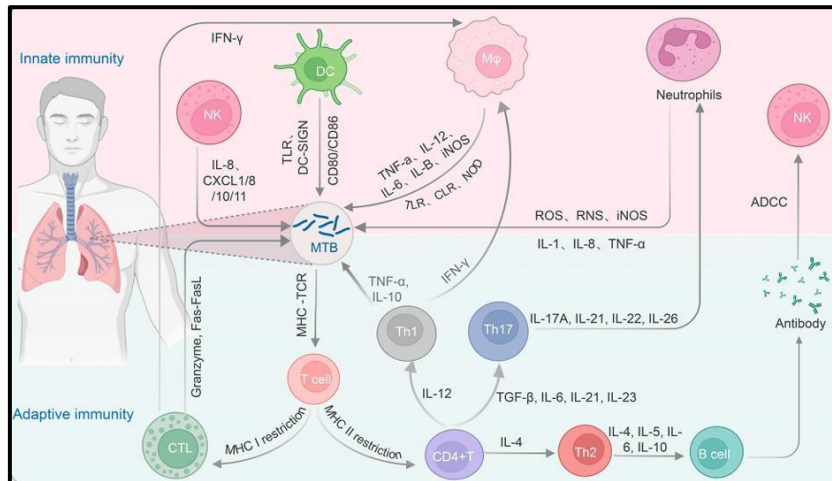


Gambar 1. Visualisasi Mikroskop Elektron *Mycobacterium tuberculosis* (Kalscheuer et al, 2019)

I.2.2 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

MTB menginfeksi makrofag alveolar dan sel epitel, yang melapisi permukaan paru-paru dan ditransmisikan melalui tetesan aerosol ketika individu yang terinfeksi batuk, bersin, atau berbicara. Masuknya MTB ke dalam makrofag melalui lipid yang dikenal sebagai phthiocerol dimikoserat merupakan faktor virulensi utama. Setelah infeksi, MTB akan dikurung melalui pembentukan granuloma. Namun, ini tidak selalu berhasil dalam mengendalikan infeksi, dan MTB telah berevolusi dengan berbagai mekanisme untuk menghindari respons imun inang (Vu et al., 2024). Tuberkulosis dapat terjadi karena infeksi primer maupun sekunder. Infeksi primer terjadi karena tidak ada keterlibatan tuberkulosis paru dan kuman secara langsung yang menginfeksi mukosa laring melalui partikel udara dan mengakibatkan terbentuknya granuloma. Pada infeksi sekunder, tuberkulosis terjadi bisa karena mekanisme penyebaran secara langsung dari tuberkulosis paru yang aktif dan luas (Safitri & Surarso, 2023).

Infeksi MTB sangat terkait dengan kekuatan sistem kekebalan tubuh. Sistem kekebalan tubuh manusia memainkan peran penting dalam pengawasan kekebalan, pertahanan, dan regulasi, mengenali dan menghilangkan patogen dan virus yang menyerang untuk menjaga homeostasis. Respon imun terhadap antigen MTB dapat dibagi menjadi dua kategori: imunitas bawaan (juga dikenal sebagai respon imun non spesifik atau alami) dan imunitas adaptif (juga dikenal sebagai respon imun yang didapat atau spesifik). Ketika MTB masuk ke paru-paru melalui saluran pernapasan, tubuh segera mengaktifkan dan mengarahkan neutrofil, makrofag, sel natural killer (NK), dan sel dendritik (DC) ke lokasi infeksi. Sel tersebut, berperan dalam melawan MTB melalui fagositosis dan pelepasan molekul anti mikroba (TNF- α , IL-12, IL-10, IL-6, dan iNOS). Selain itu, MTB juga menghadapi *antipresenting cell* (APC) yang menghasilkan antigen kepada sel T, sehingga sel T menjadi aktif. Sel T CD4+ yang aktif dapat menjadi berbagai *subtype* sel helper, sedangkan sel T CD8+ dapat membunuh sel yang terinfeksi sehingga membantu melawan MTB (Zhuang et al. 2023).



Gambar 2. Mekanisme Respon Imun Tubuh Terhadap Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*
(Zhuang et al., 2023)

Setelah infeksi MTB, inang biasanya menunjukkan salah satu dari tiga hasil yaitu sekitar 5% dari individu yang terinfeksi dapat menghilangkan MTB dari tubuh mereka, 5-10% lainnya berkembang menjadi TBC aktif sementara sekitar 90% mengembangkan infeksi tuberkulosis laten dengan menyimpan patogen dalam jangka panjang tanpa penyembuhan lengkap. Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap hasil ini meliputi aspek inang dan bakteri, di antaranya perubahan status imun inang yang merupakan penyebab paling langsung dari progresivitas infeksi MTB, sementara virulensi dan invasivitas MTB termasuk di antara faktor utama yang mempengaruhi perjalanan infeksi (Zhuang et al., 2023).

1.2.3 Vaksin Rekombinan

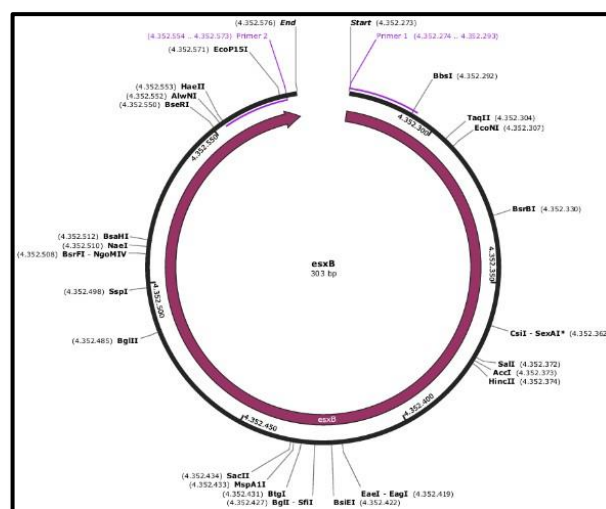
Vaksin Bacillus Calmette-Guérin BCG, yang berasal dari *M. bovis*, telah digunakan di seluruh dunia sejak tahun 1921 untuk mencegah TBC pada manusia. Vaksin ini digunakan secara luas tetapi memiliki reaksi negatif setelah digunakan (Lawrence, 2024). Vaksinasi BCG memicu reaksi hipersensitivitas sel yang tertunda, yang biasanya terjadi 4 hingga 8 minggu vaksin. Gejala klinis dari komplikasi terkait BCG diklasifikasikan berdasarkan lokasi keterlibatan yaitu limfadenopati aksila, sementara, limfadenopati aksila bersamaan dengan limfadenopati servikal atau supraklavikula (Fazlollahi et al., 2024). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan vaksin yang lebih efektif untuk menghindari komplikasi reaksi. Pengembangan vaksin yang dapat dilakukan yaitu Vaksin berbasis DNA, yaitu vaksin rekombinan.

Vaksin rekombinan merupakan jenis vaksin yang dikembangkan melalui teknik rekayasa genetika untuk menghasilkan antigen tertentu yang mampu menstimulasi respons imun tanpa menimbulkan risiko infeksi (Aisyah & Mulyani, 2024). Salah satu bentuk vaksin rekombinan yang banyak dikembangkan adalah vaksin subunit protein, yaitu vaksin yang hanya mengandung fragmen antigen

spesifik yang berasal dari mikroorganisme patogen. Vaksin subunit protein rekombinan diproduksi dengan memanfaatkan teknologi DNA rekombinan untuk menghasilkan protein antigen target secara terkontrol. Teknologi DNA rekombinan melibatkan proses kloning gen, yaitu teknik molekuler yang dimodifikasi untuk memperoleh produk protein spesifik sesuai kebutuhan. Dalam proses ini, gen asing yang diinginkan disisipkan ke dalam suatu vektor, kemudian dimasukkan ke dalam sel inang untuk memungkinkan replikasi dan ekspresi gen tersebut. Penyisipan gen target ke dalam vektor menghasilkan DNA rekombinan yang mampu bereplikasi secara mandiri di dalam sel inang, sehingga memungkinkan produksi protein antigen dalam jumlah yang memadai (Ardandi et al., 2024).

I.2.4 Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10)

CFP-10 adalah salah satu protein yang disekresikan oleh MTB dan memiliki peran penting dalam diagnosis imunologis tuberkulosis. CFP-10 secara signifikan meningkatkan kapasitas fagositik makrofag CFP-10 mungkin berkontribusi terhadap invasi dan kelangsungan hidup MTB dalam makrofag (Huang et al., 2025). CFP-10 dikodekan oleh gen ESXB (Rv3874) secara bersamaan dengan gen ESXA (Rv3875) dalam operon ESX-1. Sistem ESX-1 berperan dalam fungsi imunomodulator yang memungkinkan bakteri lolos dari fagosom ke sitosol, menginduksi apoptosis, menurunkan ekspresi IFN- γ yaitu sinyal penting bagi sel imun untuk melawan infeksi, dan menurunkan produksi radikal oksigen (ROS) (Malakar et al, 2023). Protein ini sangat penting untuk patogenisitas dan pertumbuhan MTB. Protein CFP-10 mengganggu proses kematian sel terprogram (apoptosis) pada makrofag dan pematangan fagosom (Mohammadnabi et al., 2024).



Gambar 3. Peta Marka Rv3874 (esxB) CFP-10
(Snappgene, 2025)

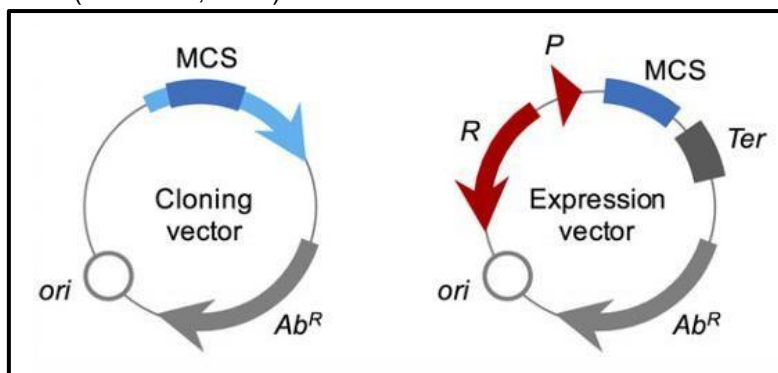
Penelitian menunjukkan bahwa protein CFP-10 diproduksi oleh MTB pada tahap awal infeksi yang sangat sensitif, CFP-10 mampu merangsang respons imun sel T, termasuk aktivasi limfosit T sitotoksik yang menghasilkan interferon- γ (IFN- γ)

sehingga dapat mencegah bakteri menerap dan berkembang biak dalam tubuh (Mohammadnabi et al., 2024). Gen ESXB (Rv3874) yang menghasilkan protein CFP-10 memiliki panjang 303 pasangan basa (pb) dan mengode 100 asam amino, sehingga menghasilkan protein dengan berat 10 kDa. Protein ini hanya ditemukan pada Mtb dan tidak dihasilkan pada BCG) (Zhu et al, 2014).

1.2.5 Vektor Ekspresi pTrcHisA

Plasmid merupakan vektor yang paling banyak digunakan dan menjadi standar dalam biologi molekuler. Vektor adalah fragmen DNA yang dapat membawa molekul DNA asing dan dimasukkan ke dalam sel inang untuk keperluan kloning. Vektor memiliki kemampuan untuk mereplikasi diri sendiri di dalam sel inang. Plasmid umumnya membawa gen yang memberikan resistensi terhadap antibiotik pada bakteri, sehingga hanya bakteri yang memiliki vektor tersebut yang mampu bertahan saat diberi perlakuan dengan antibiotik. Resistensi terhadap antibiotik ini sering digunakan sebagai penanda, salah satunya seperti gen beta-laktamase yang memberikan resistensi terhadap antibiotik kelompok beta-laktam seperti penisilin dan ampicilin (Adane & Adeladew, 2016).

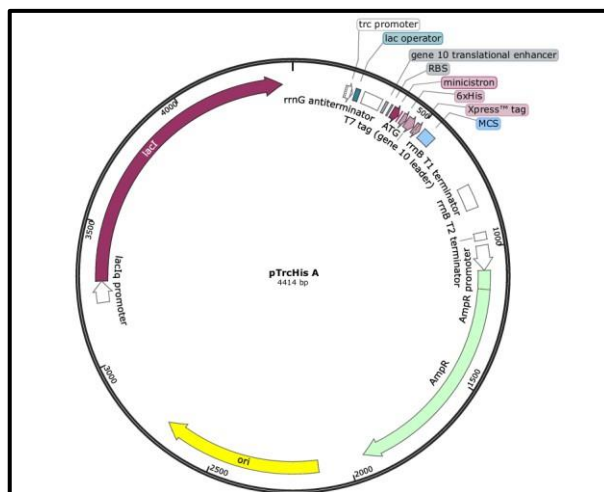
Terdapat dua jenis utama vektor plasmid yaitu vektor kloning dan vektor ekspresi, vektor kloning digunakan untuk menyalin dan menyimpan fragmen DNA, sedangkan vektor ekspresi selain untuk menyalin DNA juga dapat menghasilkan protein dari DNA yang dikloning (Kazi et al, 2022). Pada vektor kloning, (*Multiple cloning site*, *MCS*) berada dalam penanda seleksi untuk memudahkan identifikasi plasmid yang disisipkan DNA. Sedangkan vektor ekspresi, (*Multiple cloning site*, *MCS*) ditempatkan setelah system ekspresi (promotor dan regulator) dengan terminator kuat di akhir untuk memastikan transkripsi berhenti dengan baik dan plasmid stabil (Nora et al, 2018).



Gambar 4. Struktur Vektor Kloning dan Ekspresi
(Nora et al, 2018)

Vektor ekspresi umumnya terdiri dari beberapa bagian penting yang bekerja untuk memastikan gen target dapat diekspresikan dengan baik. Bagian pertama disebut replikon atau (*Origin of replication*, *ORI*), yang memungkinkan plasmid bereplikasi secara mandiri di dalam sel inang. Vektor ekspresi juga memiliki daerah promotor dan operator yang mengatur kapan dan seberapa banyak gen target

diekspresikan, promotor dapat bersifat konstitutif atau induktif, sedangkan operator berfungsi mengikat protein repressor. Bagian lain dari vektor ekspresi yaitu situs kloning ganda (*Multiple cloning site*, MCS), yaitu daerah dengan banyak situs pengenalan enzim restriksi yang memudahkan penyisipan gen target tanpa merusak plasmid. Vektor ini juga dilengkapi dengan penanda seleksi, seperti gen resistensi antibiotik yang memungkinkan untuk menyeleksi bakteri yang berhasil membawa plasmid (Jayakrishnan et al, 2024). Salah satu vektor ekspresi adalah pTrcHisA yang merupakan plasmid ekspresi prokariotik. Vektor pTrcHisA dikembangkan oleh Thermo Fisher (Invitrogen) untuk digunakan di *E. coli* dan dibangun berdasarkan ORI dari plasmid pBR322. Vektor pTrcHisA memiliki beberapa komponen yaitu *promotor trc*, *lac operator*, *rrnB anti-termination sequence*, *T7 gene 10 translational enhancer*, *Ribosome binding site*, *Mini cistron*, *6xHis tag* and *enterokinase cleavage site*, *Xpress™ epitope*, *Multiple cloning site*, *rrnB transcriptional termination sequence*, *Ampicillin resistance (bla) gene* ORF, *pBR322 origin*, dan *lacIq* ORF.



Gambar 5. Peta Marka Vektor pTrcHis A
(Sumber: Snapgene, 2025)

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Melakukan ligasi gen target Rv3874 *Mycobacterium tuberculosis* ke Vektor pTrcHisA dan ditransformasikan ke *Escherichia coli* BL21
2. Melakukan karakterisasi klon rekombinan Rv3874 – pTrcHisA dengan metode PCR koloni dan analisis restriksi plasmid rekombinan.

I.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan klon hasil rekombinan dari CFP-10 (Rv3874) yang diperkuat dengan hasil karakterisasi PCR koloni dan restriksi plasmid, sehingga dapat menjadi dasar bagi pengembangan penelitian lanjutan di bidang biologi molekuler.

BAB II

METODE PENELITIAN

I.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober - November di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC), Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.

II.2 Alat dan Bahan

II.2.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu batang L, cawan petri, mikropipet, ose bulat, tabung Eppendorf 1,5 mL dan 0,5 mL, tabung falcon 50 mL dan 15 mL, gelas ukur, sendok tanduk, rak tabung (Eppendorf dan falcon), botol reagen onemed (100 ml dan 250 ml), reagen reservoir, yellow tip, blue tip, filter tip, Elektroforesis, MiniAmp Thermal Cycler, Gel documentation, Bio-safety cabinet, Autoclave, Centrifuge, Waterbath, Microwave, Incubator shaker, Coller box, Freezer -20°C, Freezer -80°C, Kulkas 4°C, Vortex, dan timbangan analitik.

II.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolate *Mycobacterium tuberculosis*, pasangan primer spesifik (*forward SacI* dan *reverse KpnI*), vektor ekspresi pTrcHisA, kit enzim *SacI*, kit enzim *KpnI*, kit enzim T4 DNA Ligase, enzim 2x MyTaq HS Red Mix, High Pure Plasmid Isolation kit, GeneJET Genomic Purification kit, QI PCR Purification kit, Luria Bertani Broth, Nuclease free water, Water One, Ethidium Bromida, FloroSafe DNA Stain, DNA Ladder 100 pb, DNA Loading Dye 5x, Agarose, Bacteriological Agar, TBE Buffer 0,5X, Kalsium Klorida (CaCl₂), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal), *E.coli* strain BL21 chemically competent cells, gliserol 80%, IPTG, Ethanol 80%, aluminium foil, es kristal, dan micropipet tips.

II.3 Metode Kerja

II.3.2 Persiapan Isolat *Mycobacterium tuberculosis*

Isolat *Mycobacterium tuberculosis* diambil dari isolat laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC).

II.3.3 Amplifikasi Gen Rv3874

Amplifikasi gen Rv3874 dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Ukuran gen target Rv3974 yang diharapkan yaitu 303 pb. Sisi *SacI* GAGCTC menunjukkan sisi restriksi primer *forward* dan sisi *KpnI* GGTACC menunjukan sisi restriksi primer *reverse*.

Tabel 1. Rancangan Primer Gen Rv3874

Antigen	Primer	Sekuens	Sisi Restriksi
Rv3874	Forward	GTC AGA GCT CAT GGC AGA GAT GAA GAC CGA	<i>SacI</i>
	Reverse	GAC AGG TAC CGA AGC CCA TTT GCG AGG ACA	<i>KpnI</i>

Tabel 2. Komposisi Amplifikasi PCR

Komponen	Volume
Enzim kapa2g fast readymix with dye	25 µl
Primer Forward	1,5 µl
Primer Reverse	1,5 µl
Insert (DNA)	12 µl
NFW (Nuclease free water)	10 µl
TOTAL	50 µl

Proses PCR dengan siklus 30 kali mencakup *pre-denaturation* (94°C, 5 menit) *denaturation* (94°C, 1 menit), *annealing* (60°C, 50 detik), dan *extension* (72°C, 1 menit), dan *last extension* (72°C, 5 menit). Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam TBE buffer 5X, diamati menggunakan *gel documentation*.

II.3.4 Purifikasi Gen Rv3874

Purifikasi hasil PCR dilakukan sesuai manual *QIAquick PCR Purification Kit* [Qiagen]. Ditambahkan PB buffer 205 µl (5 x vol produk PCR = 5 x 41) dalam tabung Eppendorf yang berisi Rv3874 41 µl. Dipindahkan larutan dari tabung Eppendorf ke tabung koleksi melalui tabung filter lalu disentrifugasi selama 1 menit kec. 13.000 rpm, supernatant dibuang. Ditambahkan 750 µl PE Buffer dan sentrifugasi 1 menit kec. 13.000 rpm, supernatant dibuang lalu sentrifugasi kering. Tabung filter dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf baru dan ditambahkan Elution Buffer 70 µl lalu sentrifugasi 1 menit kec. 13.000 rpm, tabung filter dibuang. Hasil purifikasi dikonfirmasi menggunakan gel agarose 1% dan dibaca menggunakan *gel documentation*.

II.3.5 Restriksi Gen Rv3874 dan Vektor pTrcHisA

Gen Rv3874 yang telah dipurifikasi dilanjutkan dengan restriksi dengan menggunakan fast digest enzyme *SacI*, *KpnI*, dan fast digest 10X buffer. Selain itu, vektor pTrcHisA yang akan digunakan juga direstriksi menggunakan enzim yang sama, lalu diinkubasi 30 menit suhu 37°C dan inaktif 5 menit suhu 80°C pada mesin PCR MiniAmp Thermal Cycler. Hasil PCR dikonfirmasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dan dibaca di *gel documentation*.

Tabel 3. Komposisi Restriksi Gen Rv3874 dan pTrcHis A

Komponen	Rv3874	pTrcHis A
Insert (DNA)	10 µl	5 µl
Fast digest 10x buffer	2 µl	2 µl
<i>SacI</i>	1 µl	1 µl
<i>KpnI</i>	1 µl	1 µl
NFW (Nuclease Free Water)	16 µl	11 µl
TOTAL	30 µl	20 µl

II.3.6 Pembuatan Sel Kompeten *Escherichia Coli BL21*

Sel kompeten yang digunakan adalah *Escherichia Coli BL21*. Koloni tunggal *E. coli BL21* dinokulasikan dalam 10 mL media Luria Bertani (LB) lalu diinkubasi shaker suhu 37°C selama 16-18 jam. Hari berikutnya, dipindahkan 1% kultur sebelumnya ke tabung falcon baru berisi 22,6 mL media LB cair lalu inkubasi shaker ±2 jam 30 menit, suhu 37°C. Setelah itu, didinginkan dalam es 15 menit. Dilanjutkan sentrifugasi 10 menit kec. 4.000 rpm suhu 4°C, lalu supernatant dibuang menyisakan pellet. Ditambahkan CaCl₂ 0,1 M dingin sebanyak 2 mL dan didiamkan dalam es 10 menit. Dilanjutkan sentrifugasi 10 menit kec. 4.000 rpm suhu 4°C, supernatant dibuang sehingga menyisakan pellet. Pellet dipindahkan ke tabung Eppendorf steril lalu disentrifugasi, kemudian tambahkan CaCl₂ 300 µl dan diamkan dalam es 10 menit. Disentrifugasi 5 menit kec. 4.000 rpm suhu 4°C dan supernatant dibuang. Setelah itu, tambahkan 50 µl CaCl₂ dan disimpan dalam es hingga digunakan.

II.3.7 Ligasi Gen Rv3874 ke Vektor pTrcHis A

Gen Rv3874 hasil restriksi sebelumnya diligasikan ke vektor pTrcHisA dengan lama inkubasi 10 menit suhu 22°C pada mesin PCR *MiniAmp Thermal Cycler*. Berikut komposisi ligasi gen Rv3874.

Tabel 4. Komposisi Ligasi Gen Rv3874

Komponen	Volume
Insert (Rv3874)	5 µl
Vektor pTrcHisA	3 µl
T4 Ligase	1 µl
Buffer 10X Fast Buffer	2 µl
NFW	9 µl
TOTAL	20 µl

II.3.8 Transformasi Plasmid Rekombinan (Rv3874-pTrcHisA) ke *Escherichia Coli BL21*

Transformasi plasmid rekombinan dilakukan dengan metode *heat shock* menggunakan Waterbath. Sebelum mulai dinyalakan waterbath lalu atur hingga suhu 42°C. Disiapkan media LB padat steril 50 µl yang mengandung ampisilin 50 µl dan IPTG 50 µl. Dimasukkan media ke cawan petri steril lalu tunggu memadat. Tahap selanjutnya, diambil hasil ligasi 10 µl lalu dimasukkan ke dalam sel kompeten yang telah dibuat sebelumnya dan diamkan 30 menit dalam es. Setelah itu, dilakukan

heatshock selama 45 detik dalam waterbath suhu 42°C, lalu inkubasi 15 menit dalam es. Selanjutnya, hasil transformasi ditambahkan 1.000 µl LB cair dan inkubasi shaker selama 1 jam kec. 175 rpm suhu 37°C. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi 1 menit kec. 8.000 rpm lalu supernatant dibuang, sisakan 1 µl dan homogenkan dengan pellet. Diinokulasikan hasil transformasi ke media LB padat berisi ampisilin dan IPTG dengan metode sebar, lalu inkubasi selama 16-18 jam suhu 37°C.

II.3.9 Karakterisasi Plasmid Rekombinan

II.3.9.1 PCR Koloni

Koloni bakteri transforman (Rv3874-pTrcHisA) yang telah ditumbuhkan pada media LB padat diambil lalu dimasukkan ke Eppendorf berisi NFW 50 µl lalu dihomogenkan. Selanjutnya, dilakukan PCR koloni untuk memastikan bahwa vektor pTrcHisA telah membawa gen target yaitu Rv3874. Kondisi PCR untuk PCR koloni 30 siklus yaitu *pre-denaturation* (94°C 10 menit), *denaturation* (95°C 45 detik), *annealing* (60°C 1 menit), *extension* (72 °C 1 menit), *last extension* (72°C 5 menit). Hasil PCR dikonfirmasi pada elektroforesis gel agarose 1% dan dibaca di *gel documentation*. Berikut komposisi PCR koloni (Rv3874-pTr cHisA).

Tabel 5. Komposisi PCR Koloni

Komponen	Volume
Enzim PCR	6,25 µl
Primer forward	0,5 µl
Primer reverse	0,5 µl
DNA (Rv3874-pTrcHisA)	2,5 µl
NFW (Nuclease free water)	2,75 µl
TOTAL	12, 5 µl

II.3.9.2 Isolasi dan Restriksi Plasmid Rekombinan

Koloni bakteri transforman yang telah dikonfirmasi benar setelah dilakukan PCR koloni dilanjutkan isolasi plasmid menggunakan *High Pure Plasmid Isolation [Roche]*. Diambil koloni yang telah dicampur dengan NFW lalu disentrifugasi 10 menit kec. 4.400 rpm lalu supernatan dibuang menyisakan pellet. Selanjutnya, ditambahkan 250 µl suspension buffer dan dihomogenkan dengan dibolak-balik 6 kali. Selanjutnya, ditambahkan 250 µl lysis buffer dihomogenkan lalu diinkubasi 5 menit pada suhu 15-25 °C. Setelah itu, ditambahkan 350 µl binding buffer dingin lalu homogenkan dan inkubasi dalam es 5 menit (tidak boleh lebih dari 5 menit). Kemudian, disentrifugasi 10 menit kec. 13.000 rpm.

Disiapkan tabung filter lalu masukkan ke dalam tabung koleksi. Pindahkan supernatant dari tabung Eppendorf ke dalam tabung koleksi melalui tabung filter lalu sentrifugasi 1 menit kec. 13.000 rpm dan buang supernatant yang ada dalam tabung koleksi. Selanjutnya, ditambahkan wash buffer I melalui tabung filter sebanyak 500 µl, sentrifugasi 1 menit kec. 13.000 rpm (supernatant dibuang). Ditambahkan wash buffer II melalui tabung filter sebanyak 700 µl, sentrifugasi 1 menit kec. 13.000 rpm (supernatan dibuang beserta tabung koleksi). Selanjutnya, tabung filter dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf baru lalu ditambahkan Elution buffer sebanyak 100 µl,

sentrifugasi 1 menit kec. 13.000 rpm (tabung filter dibuang). Tabung Eppendorf telah berisi hasil isolasi plasmid sebanyak 100 µl.

Plasmid rekombinan (Rv3874-pTrcHisA) yang telah diisolasi dilakukan restriksi menggunakan enzim *SacI*, *KpnI*, Buffer 10X lalu diinkubasi 30 menit suhu 37°C dan inaktif 10 menit suhu 80°C pada mesin PCR *MiniAmp Thermal Cycler*. Berikut komposisi restriksi hasil isolasi plasmid. Hasil restriksi dikonfirmasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dan dibaca di *gel documentation*

Tabel 6. Komposisi Restriksi Plasmid

Komponen	Volume
Insert (Plasmid)	5 µl
Buffer 10X	2 µl
<i>SacI</i>	1 µl
<i>KpnI</i>	1 µl
NFW (Nuclease free water)	11 µl
TOTAL	20 µl